



Ministério da Educação
Universidade Federal de São Paulo



Juliana Galdino Janeiro

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE
INFRAVERMELHO SOBRE A INFLAMAÇÃO PULMONAR EM
MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE.**

Santos

2017

Juliana Galdino Janeiro

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE
INFRAVERMELHO SOBRE A INFLAMAÇÃO PULMONAR EM
MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a
Universidade Federal de São Paulo - *Campus*
Baixada Santista como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em Fisioterapia.

Orientadora: Profa. Dra. Liria Yuri Yamauchi

Coorientadora: Profa. Dra. Livia Assis Garcia

Santos

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a minha família por todo suporte e coragem para que eu chegasse até aqui. Meus pais pelo apoio, amor e carinho, por me darem a base e conselhos. Agradeço especialmente aos meus avós por dividirem comigo seu lar e atenção.

Agradeço ao meu namorado e companheiro de vida Felipe, que esteve comigo desde o início desta etapa, pelo apoio e paciência.

Agradeço a minha orientadora Liria e a minha coorientadora Livia pela oportunidade, aprendizado, e principalmente pela confiança.

Agradeço a todos que me ajudaram de alguma maneira nos experimentos no laboratório, especialmente a Larissa e Juliana que dividiram as extensas horas de análises comigo.

Agradeço aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, mesmo que em pensamento, especialmente Mariana, Victor e Francieli, sem vocês a graduação não teria sido a mesma. Aos amigos de longa data, Annabella, Letícia, Victor e Murilo, que ajudam a construir minha história há mais de dez anos.

Agradeço ao *CNPq* pelo apoio e financiamento desse trabalho.

RESUMO

A sepse é definida como presença de disfunção orgânica ameaçadora à vida, secundária à resposta desregulada do organismo à infecção. A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) comumente relaciona-se com a sepse e tem associação com altas taxas de mortalidade. A terapia laser de baixa intensidade (LLLT) é um recurso complementar e não invasivo utilizado para fins terapêuticos, como um tratamento seguro e efetivo. Estudos demonstram que a LLLT reduz o número de células inflamatórias e de enzimas responsáveis pela liberação de fatores quimiotáticos na fase inicial da inflamação. Além disso, há um aumento dos níveis de enzimas antioxidantes em vários modelos de patologias inflamatórias. Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar e comparar os efeitos da LLLT sobre a inflamação pulmonar induzida pela sepse em ratos por meio da técnica de ligadura e perfuração cecal (CLP). Foram utilizados 16 ratos Wistar, machos, com três meses de idade e massa corporal média de 300 ± 20 g, divididos em dois grupos: (S) Sepse - indução da sepse e eutanásia 24 h após indução; (SLI) Sepse e laser 830 nm- indução da sepse, tratamento com LLLT no comprimento de onda infravermelho. A irradiação foi realizada imediatamente após a cirurgia nas seguintes regiões: região anterior da traqueia e nas regiões ventrais do tórax, bilateralmente, logo abaixo das costelas. Foi realizada a análise do LBA (lavado broncoalveolar) e a análise histológica do tecido pulmonar. Os resultados demonstraram que o grupo SLI apresentou uma diminuição do número de células inflamatórias quando comparado ao grupo S tanto no LBA quanto na análise histológica do tecido pulmonar. Estes resultados sugerem que a LLLT influencia diretamente a modulação da resposta inflamatória pulmonar secundária à sepse. No entanto, é necessária uma análise mais aprofundada para esclarecer os possíveis efeitos terapêuticos da LLLT neste modelo de sepse.

Palavras-chave: Terapia com Luz de Baixa Intensidade; Sepse; Inflamação; Pulmão

ABSTRACT

Sepsis is defined as the presence of life-threatening organ dysfunction due to dysregulated host response to infection. Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is related with sepsis and also has high mortality rate. Low-Level Laser Therapy (LLLT) is a non-invasive complementary resource, which is considered as a safe and effective device for treatment. It is well established in the literature that LLLT can decrease the inflammatory cells and enzymes responsible for releasing chemotactic factors in early stages of inflammation. Furthermore, it is capable of increasing the levels of antioxidant enzymes in various models of inflammatory pathologies. The objective of the study was to evaluate and compare the effects of LLLT on pulmonary inflammation induced by sepsis through cecal ligation and puncture (CLP) model on rats. Sixteen male Wistar rats with three months old and average body mass of 300 ± 20 g were selected for the present study. The experimental models were distributed into two groups which were identified as sepsis group (S) with induced sepsis and euthanasia 24 hours post sepsis induction, and sepsis and laser 830 nm group (SLI) which received induced sepsis, LLLT treatment with infrared wavelength. Laser irradiation was applied after surgery on trachea's anterior part and thorax's ventral part, bilaterally right bellow the ribs. Bronchoalveolar lavage (BAL) and pulmonary tissue histology analyses were made. The results of BAL analysis presented a decrease in the amount of inflammatory cells on SLI group when compared to S group. These findings suggest the direct effect of LLLT on modulation of inflammatory response due to sepsis. However, further analysis is required to understand the therapeutic effects of LLLT on this type of sepsis model.

Key-words: Low-Level Light Therapy; Sepsis; Inflammation; Lung.

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ATP: trisfosfato de adenosina

CLP: Ligadura e punção cecal (do inglês: *cecal ligation and puncture*)

CEUA: Comitê Experimental Uso de Animais

cm: centímetros

cm²: centímetros quadrados

Ga-Al-As: Arseneto de Gálio-Alumínio

HE: Hematoxilina-eosina

IL: Interleucina

J: Joule

J/cm²: Joule por centímetro quadrado

mW: milliwatts

mg/Kg: miligrama por kilograma

NIR: infravermelho (do inglês: *nearinfrared*)

nm: nanometro

LBA: Lavado broncoalveolar

LLLT: Terapia laser de baixa intensidade (do inglês: *Low Level Laser Therapy*)

LPA: Lesão Pulmonar Aguda

LPS: Lipopolissacarídeo

PBS: Tampão salina fosfato (do inglês: *Phosphate-buffered saline*)

S: Grupo indução da sepse e eutanásia 24 h após indução

SDRA: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

SLI: Grupo indução da Sepse e tratamento com laser 830 nm.

TNF: Fator de necrose tumoral (do inglês: *Tumor Necrosis Factor*)

UTIs: Unidades de terapia intensiva

W/cm²: Watt por centímetro quadrado

° C: grau *celsius*

SUMÁRIO

Resumo

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. Terapia Laser de Baixa Intensidade.....	9
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivos gerais.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Local.....	13
3.2. Animais de experimentação.....	13
3.2.1. Cuidados no perioperatório.....	13
3.3. Grupos experimentais.....	14
3.4. Modelo experimental de sepse crônica.....	14
3.5. Protocolo da LLLT.....	15
3.6. Processamento das amostras e eutanásia dos animais.....	15
3.6.1. Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar.....	15
3.6.2. Processamento Histológico do pulmão.....	16
3.7. Análises.....	16
3.7.1. Análise Histológica.....	16
3.7.2. Análise Estatística dos resultados.....	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1. Observação Geral dos Animais.....	18
4.2. Análise Histológica do Tecido Pulmonar.....	18
4.3. Análise das Células do Lavado Broncoalveolar.....	19
5. DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÃO.....	22
7. REFERÊNCIAS.....	23
ANEXO 1.....	26

1. INTRODUÇÃO

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é definida como uma condição de insuficiência respiratória aguda decorrente de uma lesão de natureza inflamatória, que tem por característica lesão no epitélio alveolar, aumento da permeabilidade dos capilares pulmonares, e a formação de edema pulmonar rico em proteínas (RANIERI *et al.* 2012).

Segundo Rubenfeld *et al.* (2005), os Estados Unidos da América têm 190.600 casos de lesão pulmonar aguda (SDRA leve) por ano, que são associadas a 74.500 mortes e 3,6 milhões de dias de internação. Os autores consideram que a lesão pulmonar aguda tem um impacto considerável na saúde pública e que a incidência tem aumentado nos últimos anos.

Em um estudo realizado em 45 Unidades brasileiras de Terapia Intensiva entre 1º de Junho de 2011 e 31 de julho de 2011, foram diagnosticados 242 (31%) pacientes com SDRA de acordo com a definição de Berlim. O índice de mortalidade na população com SDRA foi de 46% e 52%, em UTIs e hospitais, respectivamente. A mortalidade na UTI associada a SDRA moderada e grave pela definição de Berlim foi de 55% e a mortalidade hospitalar foi de 60% (AZEVEDO *et al.* 2013).

A SDRA pode ser causada por mecanismos diretos ou indiretos. Mecanismos diretos incluem sepse com foco pulmonar, politraumatismo, trauma de tórax, transfusões, pancreatite, aspiração, contusão pulmonar, pneumonia e quase afogamento. Os riscos que envolvem mecanismos indiretos consistem em traumas não torácicos graves, choque, queimaduras e circulação extracorpórea (SINGH *et al.* 2014). O fator de risco mais comum para SDRA é a sepse com foco pulmonar, seguida de sepse com foco suspeito extra-pulmonar (RUBENFELD *et al.* 2005).

A sepse é definida como presença de disfunção orgânica ameaçadora à vida, secundária à resposta desregulada do organismo à infecção (SINGER *et al.* 2016). O quadro de inflamação sistêmica da sepse, ao acometer os pulmões, apresenta edema pulmonar de origem não cardiogênica, resultante de alterações da membrana alvéolo-capilar. O preenchimento alveolar com este edema reduz a complacência pulmonar. Outro fator que contribui para esta redução é a falta de surfactante devido à lesão dos pneumócitos, entre outras células do epitélio alveolar.

Do ponto de vista clínico, a SDRA é caracterizada por um quadro de dispneia, hipoxemia, insuficiência respiratória e infiltrado pulmonar bilateral na radiografia de tórax, compatível com o edema (RANIERI *et al.* 2012). Durante a fase aguda da lesão, um arsenal de citocinas, entre elas o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1, interleucina 8, incitam e perpetuam a inflamação. Em decorrência do aumento do estresse oxidativo e da atividade de proteases, o processo inflamatório local reduz a produção de surfactante e inativa o surfactante local, levando à formação de atelectasias. Adicionalmente, as elastases lesam a estrutura pulmonar e podem ser observadas lesões alvéolo-capilar e epiteliais (MATTHAY, 2011).

1.1 Terapia laser de baixa intensidade

A terapia laser de baixa intensidade, do inglês *low level laser therapy* – LLLT, é a aplicação de luz em patologias com o objetivo de promover regeneração tecidual, redução da inflamação e alívio da dor. Esta luz de baixa potência está na faixa de 1mW a 500mW. A luz é tipicamente de largura espectral estreita, no vermelho ou próximo ao espectro infravermelho (do inglês, *nearinfrared* – NIR), de 600 nm a 1000 nm, com um poder de densidade (irradiância) entre 1mw a 5 W/cm². Diferentemente, há outros procedimentos médicos com laser e o LLLT não é um mecanismo ablativo ou térmico, e sim uma fotoestimulação. Este efeito pode ser comparado à fotossíntese nas plantas, no qual a luz absorvida exerce uma mudança química (HUANG *et al.* 2009). A primeira publicação deste fenômeno foi em 1967, por Endre Mester, da Universidade de Semmelweis de Budapeste, Hungria. Mester conduziu um experimento para testar se a LLLT poderia causar câncer em camundongos. Após tricotomia no dorso dos animais, houve uma divisão destes em dois grupos sendo um irradiado com um LLLT de rubi (694-nm). O grupo tratado não evoluiu com câncer, entretanto, os pelos cresceram muito mais rápido. Ele denominou este fenômeno como bioestimulação (MESTER, 1966).

Desde meados de 1960, o uso da energia da luz com fins terapêuticos para processos inflamatórios e trofismo celular abriu um novo campo de interação entre a energia eletromagnética com o tecido biológico. A fotobioestimulação é o processo pelo qual a LLLT ativa as funções celulares sem causar aquecimento significativo do tecido. A LLLT

pode estimular e/ou inibir um processo biológico, isto depende do tipo de tecido, da dose de irradiação e da ação de modulação atribuível a isso. A LLLT tem sido amplamente usada no controle de processos inflamatórios, no reparo de lesões de pele, doenças reumatológicas, osteo-artro-miopatias, doenças neuromusculares, lesões do esporte, entre outras (SERVETTO *et al.* 2010). A LLLT reduz as células inflamatórias e as enzimas responsáveis pela liberação de fatores quimiotáticos na fase inicial da inflamação. Além disso, este inibe a síntese de prostaglandinas e citocinas e aumenta os níveis de enzimas antioxidantes em vários modelos de inflamação (ASSIS *et al.* 2012). Segundo Aimbire *et al.* (2007), entre as intervenções não farmacológicas, o laser é possivelmente a terapia moduladora do processo inflamatório mais promissora, por ser um tratamento inofensivo (inócuo) e efetivo, representando uma boa alternativa às drogas. Os efeitos da LLLT em lesões do sistema respiratório tem sido estudada. Todos os estudos, em diversos modelos de indução de lesão pulmonar, demonstraram a redução de mediadores inflamatórios e que a LLLT pode ser útil em patologias pulmonares onde o TNF alfa é um mediador predominante, reduzindo sua expressão (DE LIMA *et al.* 2011). Entretanto, a dose usada tem influência direta nesta redução (AIMBIRE *et al.* 2006).

Diante do exposto, torna-se evidente que a sepse está associada a uma substancial incapacidade física para os indivíduos acometidos e a altos custos socioeconômicos. O dano pulmonar decorrente de um processo inflamatório sistêmico está diretamente associado a declínio da função física e mental do paciente acometido, constituindo um importante desafio à reabilitação. Com isso, pesquisas que tenham como objetivo desenvolver intervenções que amenizem e/ou previnam as alterações sistêmicas inerentes à evolução da doença são de extrema importância, diminuindo custos e reduzindo os índices de mortalidade relacionados a complicações da doença.

No entanto, pouco é conhecido a respeito dos efeitos da interação destes recursos com o tecido pulmonar na sepse. Dentro desse contexto, este projeto visa contribuir de forma significativa na elucidação de mecanismos celulares, através dos quais a LLLT interage com o tecido pulmonar na sepse.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Avaliar os efeitos da LLLT infravermelho sobre a resposta inflamatória pulmonar em modelo experimental de sepse induzida por ligadura e punção cecal (CLP).

2.2 Objetivos Específicos

Investigar os efeitos da LLLT sobre os aspectos morfológicos e morfométricos da inflamação pulmonar durante a sepse.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local

Este projeto foi realizado no laboratório de Biologia Molecular e Celular, do Departamento de Biociências da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp - *Campus* Baixada Santista).

3.2. Animais de experimentação

Para a execução do estudo proposto, foram utilizados 16 ratos (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), da linhagem *Wistar*, machos, com três meses de idade e massa corpórea média de 300 g, provenientes do Centro de Bioterismo de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME). Os animais foram mantidos na Sala de Guarda de Animais do Departamento de Biociências da Unifesp – *Campus* Baixada Santista. Durante todo o procedimento experimental permaneceram em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura na faixa de 22°-27°C e ambiente higienizado), recebendo ração própria comum e água *ad libitum*. Todo o manuseio de animais e os procedimentos cirúrgicos foram realizados estritamente de acordo com os Princípios Orientadores para o Uso de Animais de Laboratório. Este estudo foi aprovado pelo Comitê Experimental Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA nº 8948050515 – anexo 1).

3.2.1. Cuidados no perioperatório

- Pré-operatório: desinfecção dos equipamentos e mobiliários antes e após o uso; analgesia preemptiva, com aplicação de opióides antes do procedimento cirúrgico (morfina 5mg/kg).
Uso de aquecimento pré-anestesia.

- Anestesia: ajuste da dose para o recomendado pelo CEUA (cetamina 80mg/kg, xilazina 8mg/kg)
- Tricotomia ampla e assepsia com gaze e clorexidine e álcool 70% ou iodo degermante.
- Esterilização de instrumental, campo cirúrgico, luvas, avental, gaze e algodão.
- Após a cirurgia, identificação com etiqueta na caixa com data da cirurgia, dias e horários da aplicação realizada com analgésico e acompanhamento diário do animal, com aplicação na frequência demandada.
- O uso de antibióticos e antiinflamatórios no período pós-operatório não foi realizado, uma vez que o modelo de lesão é de sepse. Ressaltamos que o animal foi mantido com analgesia de horário durante todo o período pós-operatório (morfina de 4/4 horas, 5mg/kg).

3.3. Grupos experimentais

Foram utilizados 16 animais, os quais foram pesados e distribuídos aleatoriamente em 2 grupos:

- **Grupo 1- (S) Sepse** - indução da sepse e eutanásia 24 h após indução.
- **Grupo 2 - (SLI) Sepse e laser 830 nm-** indução da sepse, tratamento com LLLT no comprimento de onda infravermelho e eutanásia 24 h após indução.

3.4. Modelo experimental de sepse crônica

O modelo de sepse crônica foi obtido por meio da técnica de ligadura cecal associada com perfuração com agulha, como descrito inicialmente por Wichterman *et al.* (1980). Os animais foram pesados e anestesiados, via intraperitoneal, com a associação de Ketamina (80 mg/Kg) e Xilazina (8 mg/Kg). Após a anestesia, os animais foram submetidos à laparotomia mediana, com extensão de 2 a 3 cm, e em seguida, o ceco foi identificado. Utilizando-se manobra digital foi realizado o preenchimento do conteúdo do ceco, em sentido proximal. A ligadura total oclusiva do ceco foi feita em sua região central, entre a junção ileocecal e a porção apical. Para a localização exata da ligadura foi usado um paquímetro. Após a ligadura, 2 punções foram feitas na superfície antimesentérica do ceco ligado com uma agulha de calibre de 22 Gauge, permitindo a passagem de algum material fecal na cavidade abdominal à leve compressão local. Previamente a reintrodução do ceco na cavidade abdominal, o

conteúdo exposto foi umedecido com soro fisiológico aquecido a 30°C. A incisão foi suturada e a limpeza local realizada. Logo após a cirurgia, foi administrado analgésico (Morfina 5mg/kg). Além disso, os animais foram mantidos por algumas horas em ambiente aquecido com a finalidade de se evitar hipotermia.

3.5. Protocolo da LLLT

Para os grupos irradiados, foi utilizado o aparelho portátil de LLLT (Photonlase III, DMC[®] equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil) com os seguintes parâmetros: 808 nm (semicondutor arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs) diodo), emissão contínua, potência de saída de 30 mW, área do feixe de 0.028 cm², dose de 30 J/cm², energia de irradiação pontual de 0.8 J, e tempo de irradiação de 28 segundos.

A irradiação foi realizada pela técnica pontual com contato, imediatamente após a indução em 3 pontos: região anterior de traqueia e nas regiões ventrais do tórax, bilateralmente, logo abaixo das costelas.

3.6. Processamento das amostras e eutanásia dos animais

Ao término do período experimental (24 horas após a indução da sepse), os animais foram anestesiados e exsanguinados através da artéria aorta abdominal. Em seguida, entubados via orotraqueal com cânula de polietileno. Os pulmões e coração foram retirados em monobloco, sendo a cânula traqueal mantida e conectada à traqueia.

3.6.1. Coleta e Análise do Lavado Broncoalveolar

O Lavado Broncoalveolar (LBA) foi realizado com instilação de 10 mL de solução salina pela traqueia e pulmão direito, a seguir, centrifugado a 1.000 rpm por 10 minutos a 5°C. Depois da centrifugação e retirada do sobrenadante, o *pellet* celular foi ressuspensionado com 5 mL de PBS para a contagem do número total de células por mL, realizada em câmara de Neubauer.

3.6.2. Processamento histológico do pulmão

Após a coleta de sangue e LBA, os animais foram eutanaziados e foi introduzido 5 ml de paraformaldeído (4%) na canula traqueal. Para remoção, a caixa torácica anterior e o pulmão foram clampeados e retirados em bloco para imersão imediata em paraformaldeído (4%) por 24 horas para fixação do tecido.

O processo histológico foi de acordo com o seguinte protocolo: Álcool 50% por 1 hora, álcool 70% *overnight*, álcool 80% por 1 hora, álcool 95% por 1 hora, álcool 100% I por 30 min, álcool 100% II por 30 min, álcool 100% III por 30min, mistura álcool xilol 1:1 por 15 min, xilol (puro) I de 15 a 30 min até diafanizar, xilol (puro) II por 30 min, parafina por 2h, inclusão do material.

Foram realizados cortes de 3 micrometros, colocados em lâminas e posteriormente em estufa a 60°C por aproximadamente 12 horas. Após desparafinização, parte dos cortes foi corado com hematoxilina-eosina (HE).

3.7. Análises

3.7.1 Análise Histológica

Cortes de 3 micrometros do pulmão esquerdo foram montados sobre lâmina histológica, corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). Foi realizada a escolha aleatória de um corte por lâmina e mensurados 5 campos distintos, percorrendo todo pulmão, por meio de um microscópio óptico (Axiolab) com uma câmera digital acoplada (Sony DSCs75) em um aumento de 400x. Para garantir que as regiões fotografadas fossem distintas, tomou-se como referência a captura de imagem de um campo, espaço de dois campos e somente o próximo era fotografado. Dentro de cada área fotografada, as células inflamatórias foram marcados e contados, utilizando o programa Axionvision 3.1 ImageAnalysis (Carl Zeiss)[®]. Por fim, foi calculado a média do número de macrófagos referentes a cada lâmina.

A análise foi feita sem conhecimento do grupo experimental.

3.7.2. Análise Estatística dos Resultados

Os dados foram analisados estatisticamente através de técnicas descritivas, tais como tabelas e gráficos, na forma de média e desvio padrão. Na comparação entre os grupos foi utilizado o Teste-T de Student para amostras independentes. Para as conclusões das análises estatísticas foi considerado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4.RESULTADOS

4.1 Observação geral dos animais

Os 16 animais utilizados para este estudo recuperaram-se sem intercorrências da cirurgia de indução e o protocolo de LLLT. Não foram observados sinais de respostas teciduais macroscópicas adversas durante o período experimental.

Dos 16 animais, 8 animais foram do grupo S e 8 do grupo SLI.

4.2 Análise histológica do tecido pulmonar

A figura 1 representa a contagem do número de células inflamatórias. Foi possível observar uma diminuição no número de células no grupo SLI quando comparado ao grupo S ($p < 0,05$).

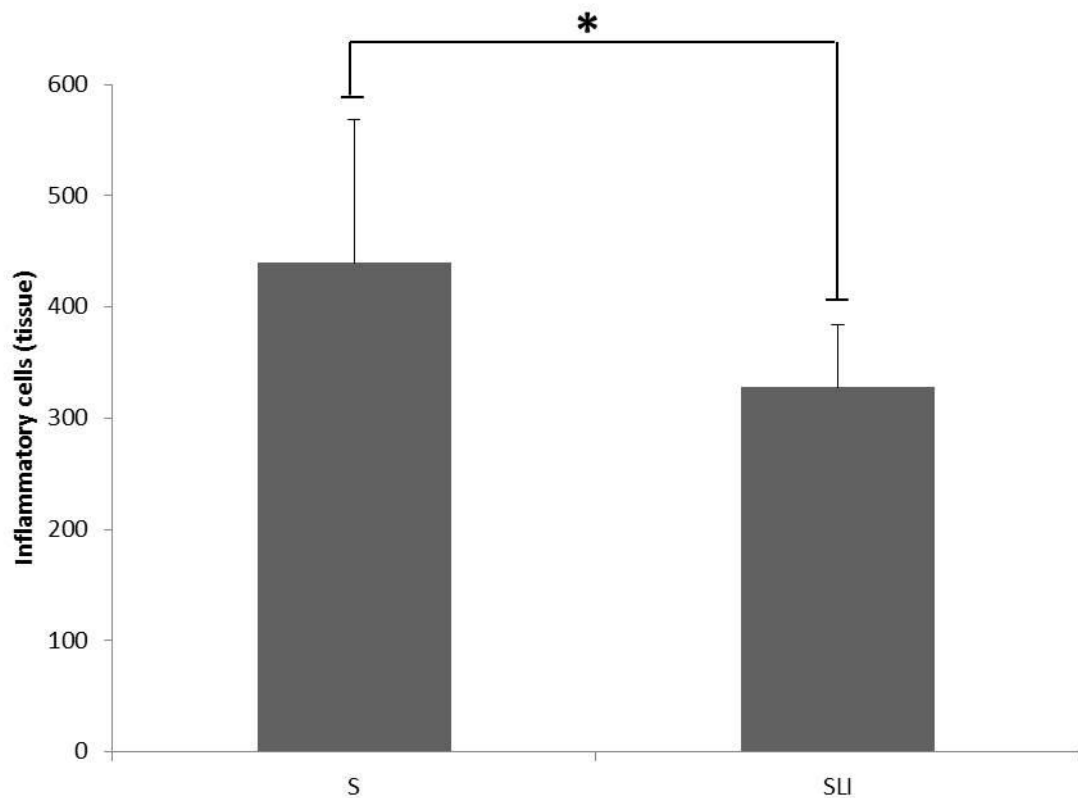


Figura 1- Análise histológica do tecido pulmonar. S: grupo sepse não tratado; SLI: grupo sepse e LLLT - 830 nm.

4.3 Análise das células do lavado broncoalveolar

A figura 2 apresenta os resultados da avaliação quantitativa das células presentes no lavado broncoalveolar. Foi possível observar uma diminuição no número de células no grupo sepse+ laser quando comparado ao grupo sepse ($p < 0,05$).

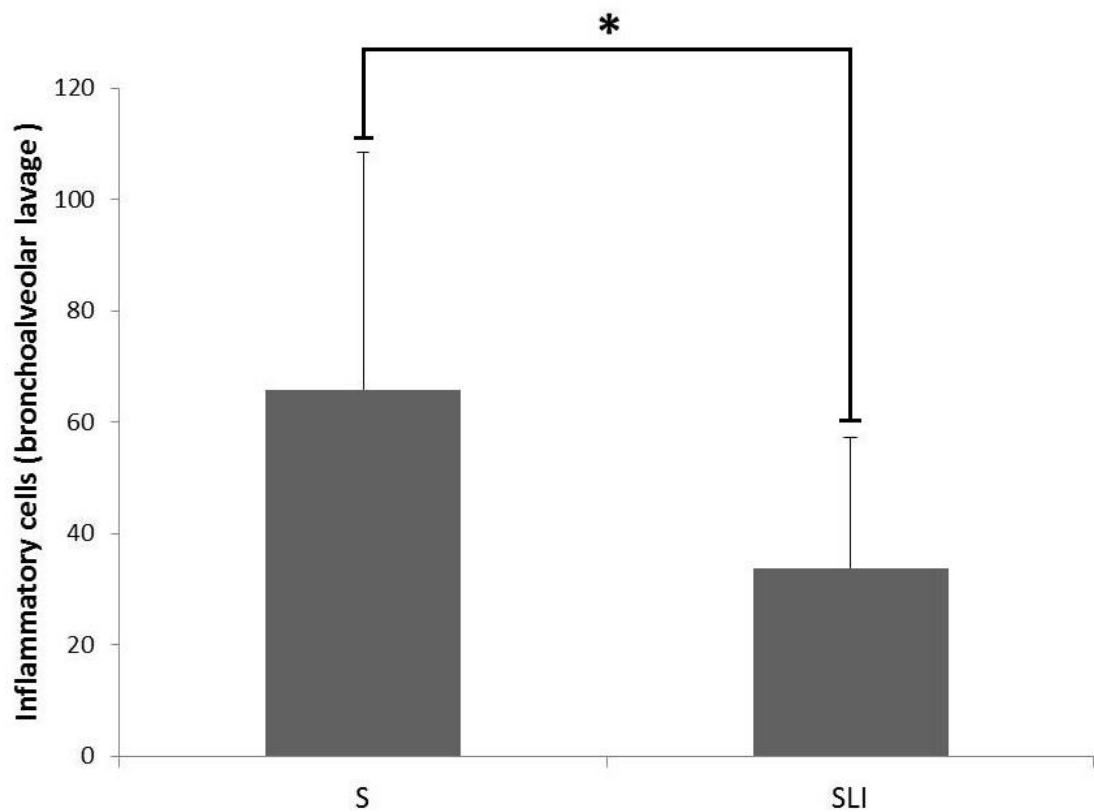


Figura 2- Análise das células do lavado broncoalveolar. S: grupo sepse não tratado; SLI: grupo sepse e LLLT - 830 nm.

As análises demonstraram que o grupo SLI apresentou uma diminuição do número de células inflamatórias quando comparado ao grupo S tanto no lavado broncoalveolar quanto na análise histológica do tecido pulmonar.

5. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo analisar os efeitos do LLLT infravermelho na resposta inflamatória pulmonar resultante da indução da sepse em ratos pela técnica ligadura e perfuração cecal (CLP). As análises estimaram que o uso do laser reduziu a quantidade de células inflamatórias no tecido pulmonar e no lavado broncoalveolar destes animais.

A sepse é um fator associado à disfunção de múltiplos órgãos, dentre os quais os pulmões. A lesão pulmonar aguda pode ocorrer como consequência da resposta inflamatória acompanhada por uma depressão na função imunológica, que é uma das bases da fisiopatologia da sepse (DOI *et al.* 2009). O modelo experimental de sepse escolhido (CLP) foi avaliado previamente por Kingsley & Win (2000), que observou que após 24h da CLP, os animais apresentaram sinais de edema pulmonar, e, após 48h, espessamento da parede alveolar, aumento da celularidade e hemorragia alveolar difusa. Além disso, a quantidade de linfócitos reduziu em torno de 50% no compartimento vascular pulmonar e no lavado broncoalveolar a quantidade dobrou de valor, o que sugere migração transendotelial de linfócitos. Este estudo concluiu que os macrófagos e linfócitos têm um papel muito importante no processo inflamatório induzido pela técnica CLP, e que este aumento é mais evidente após 48h. Nosso estudo avaliou os animais 24 horas após a indução de sepse e a análise histológica do tecido pulmonar mostrou que o número de células inflamatórias foi menor no grupo submetido à irradiação em relação ao grupo de indução da sepse. Os dados da literatura corroboram com nossos achados, pois indicam que há uma modulação da inflamação com a aplicação do laser de baixa intensidade. Souza, *et al.* (2014) observaram, através da cultura de células, que o LLLT pode modular a atividade mitocondrial e, portanto, o estado de ativação de macrófagos em um quadro inflamatório.

Em nossa revisão, identificamos um estudo que avaliou os efeitos do laser em modelo experimental semelhante, com a CLP. O estudo de Yu *et al.* (1997), fez a aplicação de laser (laser de argônio, com comprimento de onda de 630 nm e fluência de 5 J/cm²) após CLP. Uma parte dos animais foram sacrificados após 24 horas e outro grupo após 60 dias, para a avaliação da sobrevivência. Os autores observaram que houve um aumento dos níveis de ATP dos linfócitos após a aplicação de laser, e uma sobrevivência maior em 60 dias no grupo laser. O estudo concluiu que o laser não ativa linfócitos e que a maior sobrevivência dos animais pode ser devido à maior produção de ATP pelas células imunológicas.

A análise de células do lavado broncoalveolar tem sido bastante utilizada para a avaliação da inflamação pulmonar. Aimbire *et al.* (2008) compararam o efeito do laser em diferentes períodos de tempo (4h, 12h e 24h) em modelo de inflamação do pulmão induzida pelo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e observou-se que houve redução do número de células do lavado broncoalveolar em todos os tempos investigados. Em outro estudo, foi observado que o laser a uma dose de 0,11 Joules reduziu a concentração de TNF no LBA em modelo de lesão pulmonar induzida por complexo imune (Aimbire *et al.* 2006). De Lima e colaboradores (2010) observaram que o laser reduziu o número de neutrófilos no LBA de animais submetidos à lesão por meio de inalação de LPS. Embora os modelos de lesão sejam distintos ao CLP, estes estudos concluíram que o laser apresenta efeitos positivos na resposta inflamatória pulmonar aguda, evidenciando nossos resultados que demonstraram uma diminuição no número de células após 24 horas no grupo irradiado.

Segundo Aimbire *et al.* (2006) o LLLT pode diminuir a liberação de TNF em lesão pulmonar aguda, mas esse efeito parece ser altamente dependente da dose de LLLT. Em nosso estudo anterior, pudemos observar que a dose de 30 J / cm² foi mais eficaz na redução das células inflamatórias. Por outro lado, o grupo irradiado com a dose de 65 J / cm² demonstrou um aumento das células inflamatórias, sugerindo uma superdosagem na irradiação a laser, provocando efeitos inibitórios (Bublitz, 2015). A partir deste estudo inicial, constatamos a necessidade de mais investigação para elucidar os efeitos do laser sobre a inflamação pulmonar aguda, uma vez identificada a dose terapêutica de 30 J / cm².

Nossos achados apresentam resultados iniciais sobre os efeitos do laser na inflamação pulmonar secundária à sepse induzida por CLP. Acreditamos que estes dados são importantes por tratar-se de um modelo de lesão que mais se aproxima da sepse humana, por ser de origem polimicrobiana. O estudo realizado apresentou limitações importantes quanto à suas análises por serem quantitativas e não qualitativas, isto é, foi realizada a contagem total de células, entretanto, pode-se estimar a redução da quantidade de células em ambas análises.

A continuidade do estudo e a realização de mais análises poderão auxiliar na elucidação dos efeitos do laser na inflamação pulmonar induzida pela técnica de CLP.

6. CONCLUSÃO

Estes resultados sugerem que a LLLT influencia diretamente a modulação da resposta inflamatória pulmonar secundária à sepse. No entanto, é necessária uma análise mais aprofundada para esclarecer os possíveis efeitos terapêuticos da LLLT neste modelo de sepse.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RANIERI, M.V; RUBENFELD, G.D; THOMPSON, T.B; *et al.* Acute Respiratory Distress Syndrome- The Berlin Definition. Journal of the American Medical Association .Vol 307, No.23. June 20, 2012.
2. RUBENFELD, G.D; CALDWELL, E; PEABODY, E; WEAVER, J; MARTIN, D.P; NEFF, M; *et al.* Incidence and outcomes of acute lung injury. The New England journal of medicine. 2005;353(16):1685-93. Epub 2005/10/21
3. AZEVEDO, L.C; PARK, M; SLLUH, J.I; REA-NETO, A; SOUZA-DANTAS, V.C; VARASCHIN, P; *et al.* Clinical outcomes of patients requiring ventilatory support in Brazilian intensive care units: a multicenter, prospective, cohort study. Crit Care. 2013; 17(2):R63.
4. SINGH, G; GLADDY, G; CHANDY, T.T. Incidence and outcome of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in the surgical intensive care unit. Indian Journal Of Critical Care Medicine, Tamil Nadu, India, v. 18, n. 10, p.659-665, jul. 2014.)
5. RUBENFELD, G.D; CALDWELL, E; PEABODY, E; WEAVER, J; MARTIN, D.P; NEFF, M; *et al.* Incidence and outcomes of acute lung injury. The New England journal of medicine. 2005;353(16):1685-93. Epub 2005/10/21.
6. SINGER, M; DEUTSCHMAN, C.S; SEYMOUR, C.W; *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. doi:10.1001/jama.2016.0287.
7. RANIERI, M.V; RUBENFELD, G.D; THOMPSON, T.B; *et al.* Acute Respiratory Distress Syndrome -The Berlin Definition. Journal of the American Medical Association .Vol 307, No.23. June 20, 2012.
8. MATTHAY, M.A; ZEMANS, R.L. The Acute Respiratory Distress Syndrome: Pathogenesis and Treatment. Annu Rev Pathol. 2011; 6: 147–163. 2011/02/28.
9. HUANG, Y.Y; CHEN, A.C; CARROLL, J.D; HAMBLIN, M.R. Biphasic dose response in low level light therapy. Dose-response: a publication of International Hormesis Society. 2009;7(4):358-83. Epub 2009/12/17.

10. MESTER, E. A laser sugar alkamazaea a gyogyaezatban. Orv Hetilap, v.107, p.1012, 1966.
11. SERVETTO, N; CREMONEZZI, D; SIMES, J.C; MOYA, M; SORIANO, F; PALMA, J.A, *et al.* Evaluation of inflammatory biomarkers associated with oxidative stress and histological assessment of low-level laser therapy in experimental myopathy. Lasers in surgery and medicine. 2010;42(6):577-83. Epub 2010/07/28.
12. ASSIS, L; MORETTI, A.I; ABRAHAO, T.B; CURY, V; SOUZA, H.P; HAMBLIN, M.R; *et al.* Low-level laser therapy (808 nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. Lasers in surgery and medicine. 2012;44(9):726-35. Epub 2012/09/25.
13. AIMBIRE, F; LOPES-MARTINS, R.A; ALBERTINI, R; PACHECO, M.T; CASTRO-FARIA-NETO, H.C; MARTINS, P.S; *et al.* Effect of low-level laser therapy on hemorrhagic lesions induced by immune complex in rat lungs. Photomedicine and laser surgery. 2007;25(2):112-7. Epub 2007/05/19.
14. DE LIMA, F.M; VILLAVERDE, A.B; ALBERTINI, R; CORREA, J.C; CARVALHO, R.L; MUNIN, E; *et al.* Dual Effect of low-level laser therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: Action on anti- and pro-inflammatory cytokines. Lasers in surgery and medicine. 2011;43(5):410-20. Epub 2011/06/16.
15. AIMBIRE, F; ALBERTINI, R; PACHECO, M.T; CASTRO-FARIA-NETO, H.C; LEONARDO, P.S; IVERSEN, V.V; *et al.* Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNFalpha levels in acute inflammation. Photomedicine and laser surgery. 2006;24(1):33-7. Epub 2006/03/01.
16. WICHTERMAN, K.A; BAUE, A.E; CHAUDRY, I.H. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. The Journal of surgical research. 1980;29(2):189-201. Epub 1980/08/01.
17. DOI, K; LEELAHAVANICHKUL, A; YUEN, P.S.T; STAR, R.A. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. J Clin. Invest. 2009; 119(10):2868-78.
18. KINGSLEY, Y; WILMANSKI, J; WANG, C; *et al.* Lung Compartmentalization of Inflammatory Cells in Sepsis. Inflammation. Vol. 24, No. 6, 2000.

19. SOUZA, N.H.C; FERRARI, R.A.M; SILVA, D.F.T; *et al.* Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. Brazilian Journal of Physical Therapy. 2014 July-Aug; 18(4):308-314.
20. YU, W; CHI, L.R; NAIM, J.O; LANZAFAME, R.J. Improvement of Host Response to Sepsis by Photobiomodulation. Lasers in Surgery and Medicine 21:262–268 (1997).
21. AIMBIRE, F; OLIVEIRA, A.P.L; ALBERTINI, R; CORREA, J.C; *et al.* Low Level Laser Therapy (LLLT) Decreases Pulmonary Microvascular Leakage, Neutrophil Influx and IL-1 β Levels in Airway and Lung from Rat Subjected to LPS-Induced Inflammation. Inflammation, Vol. 31, No. 3, June 2008.
22. AIMBIRE, F; ALBERTINI, R; PACHECO, M.T; CASTRO-FARIA-NETO, H.C; LEONARDO, P.S; IVERSEN, V.V; *et al.* Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF α levels in acute inflammation. Photomedicine and laser surgery. 2006;24(1):33-7. Epub 2006/03/01.
23. DE LIMA, F.M; VILLAVERDE, A.B; SALGADO, M.A; CASTRO H.C.F.N; MUNIN, E; ALBERTINI, R; AIMBIRE, F. Low intensity laser therapy (LILT) in vivo acts on the neutrophils recruitment and chemokines/cytokines levels in a model of acute pulmonary inflammation induced by aerosol of lipopolysaccharide from Escherichia coli in rat. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 101 (2010) 271–278.
24. BUBLITZ, C; ASSIS L.R; RENNO A.C.M; CURY, V; HARADA, G; HIRAI, A; YAMAUCHI, L.Y . Laser therapy, used in a specific dose, modulates pulmonary inflammatory processes in an experimental model of sepsis in rats. Fisioterapia e Pesquisa; 22: 420 - 424.

ANEXO 1



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



, 07 de dezembro de 2015
CEUA N 8948050515

Ilmo(a).Sr(a). Pesquisador(a): Liria Yuri Yamauchi
Depto/Disc: Ciências Do Movimento Humano

Título do projeto: "EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE VERMELHO E INFRAVERMELHO SOBRE A INFLAMAÇÃO PULMONAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 26/outubro/2015) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: " À Profa. Dra. Monica Levy Andersen Coordenadora - CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais Projeto Pesquisa Intitulado: "Efeitos do laser de baixa intensidade vermelho e infravermelho sobre a inflamação pulmonar em modelo experimental de sepse". CEUA Nº 8948050515 Prezada Professora, Com o intuito de aperfeiçoar a metodologia do projeto, gostaríamos de solicitar a inserção de um adendo com algumas modificações relacionadas aos procedimentos cirúrgicos e seus cuidados no período perioperatório. Pré-operatório: desinfecção dos equipamentos e mobiliários antes e após o uso; analgesia preemptiva, com aplicação de opióides antes do procedimento cirúrgico. Uso de aquecimento pré-anestesia. Anestesia: ajuste da dose para o recomendado pelo CEUA. Tricotomia ampla e antisepsia. Esterilização de instrumental, campo cirúrgico, luvas, avental, gaze e algodão. Após a cirurgia, identificação com etiqueta na caixa com data da cirurgia, dias e horários da aplicação realizada com analgésico/anti-inflamatório e acompanhamento diário do animal, com aplicação na frequência demandada. O uso de antibióticos e anti-inflamatórios no período pós-operatório não será realizado, uma vez que o modelo de lesão é de indução de sepse. Ressaltamos que o animal será mantido com analgesia de horário durante todo o período pós-operatório. Estamos à disposição para eventuais esclarecimentos. Maiores detalhes estão no documento anexo. Atenciosamente, Profa. Dra. Liria Y. Yamauchi ".

Comentário da CEUA: "A Emenda com modificações relacionadas aos procedimentos cirúrgicos e seus cuidados no período peri operatório com os animais no presente estudo foram atendidas. ".

Atenciosamente

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo